

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
I P C 分類：

A6

B6

本案已向：

國(地區) 申請專利，申請日期：

案號：

，☐有 ☐無主張優先權

美國

2000年10月04日

09/678,189

☒有 ☐無主張優先權

有關微生物已寄存於：

，寄存日期：

，寄存號碼：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明(1)

發明背景

本發明係關於治療肌肉傷害之方法，特定言之，本發明係關於局部施用神經毒素於受傷害之肌肉，以治療肌肉傷害之方法。

肌肉傷害包括骨骼肌之急性傷害，如挫傷、裂傷、局部缺血、使用過度及完全破裂。這些傷害可能會引起劇烈疼痛，使患者無法工作或甚至影響正常生活之活動。在這些急性骨骼肌傷害中，使用過度(亦被認為拉傷引起之傷害)最為普遍。舉例言之，使用過度接近佔所有職業或職業運動選手傷害治療的30%，Garrett等人，Am J Sports Med, 24 (6): S2-S8, 1996。

肌肉使用過度傷害特徵在於肌肉－肌腱單位的斷裂。此種肌肉－肌腱單位的斷裂可能發生於肌肉的任何地方。此型傷害最常發生在靠近肌肉肌腱接合點(myotendinous junction, MTJ)，其係作用於兩關節間表的皮肌肉，如直股肌(femoris)、半腱肌(semiendinousus)及比目魚肌(gastrocnemius)。

肌肉傷害可能肇因於反常之運動或不尋常之使用肌肉，舉例言之，不尋常使用少許活動運動肌單位以產生較高之力量。在此情況中，過度延伸肌肉單位在拉長時會經歷過度緊張。此過度緊張可引起肌肉收縮單位微小的傷害，其集中發生在Z-線的隨意斷裂。當肌肉受到傷害時，患者可能會經歷肌肉疼痛之遲滯發作，其特徵在於疼痛、虛弱及運動範圍之限制。此疼痛最常在肌肉受傷害後劇烈約一至

五、發明說明(2)

二日，接著虛弱及限制運動範圍可持續一周或更久。若輕微之骨骼肌使用過度未被適當治療，則可能產生更嚴重之傷害。

肌肉使用過度根據其傷害之劇烈程度及血腫性質可分三種形式：(1)輕微的(第一級)過度使用，少許肌肉纖維撕裂，輕微腫大及不舒適感，伴隨無或只有極少力量之減少及運動限制；(2)中度的(第二級)過度使用，肌肉纖維較大之傷害及明顯力量之損失，及；(3)劇烈的(第三級)過度使用，斷裂延伸跨越至整個肌肉腫脹，引起肌肉功能完全喪失。

當肌肉使用過度時，肌肉內血管之斷裂常可引起大量之血腫。有二種不同形式之血腫會發生於受傷害之肌肉：肌肉內及肌肉間血腫。第一種形式，肌肉內血腫，因接觸了肌肉筋膜，而有其尺寸上之限制。於此，血液外滲增加了肌肉內的壓力，壓迫及限制其血腫之尺寸。此型的血腫會引起疼痛及肌肉功能之喪失。第二種形式，肌肉間血腫，發展於當肌肉筋膜破裂及血液外滲散佈到肌肉間空間，但肌肉內壓力則無明顯增加時。此型的血腫當肌肉中的壓力不增加時，也許不引起明顯地疼痛。

治療使用過度傷害時，固定受傷害的肌肉是必要的，特別是在受傷的第二或三天內，受傷害的肌肉在受傷後立即地移動，常會引起在原受傷害部位再次破裂。再次破裂可能會引起更嚴重的傷害、延緩痊癒及組織癢。Jarvinen等人，Curr Opin Rheumatol, vol 12:155-161 (2000)。

五、發明說明 (3)

受損傷部位的再次破裂可因受傷肌肉的固定而避免，較佳係在受傷後立即固定。固定作用可使新生成的淋巴組織到達足夠伸長的長度，以抵抗因收縮肌肉所產生的力量。

已知的固定受傷害/使用過度肌肉的方法，需要使用物理性的束縛或模具。舉例言之，頸圈可用於固定受傷害的頸屈肌或伸肌。然而使用此束縛通常是笨重且不舒適的。此外，某些肌肉傷害群，要使用物理性束縛是無法實行或是不可能的。舉例言之，要使用束縛固定上斜方肌(trapezius)或臀大肌(gluteus maximus)是非常困難的。

肉毒桿菌毒素

厭氧性、格蘭氏陽性細菌肉毒桿菌(Clostridium botulinum)製造一種有效的多肽神經毒素，肉毒桿菌毒素(botulinum toxin)，可在人類及動物中引起神經麻痺，而稱為肉毒桿菌病。肉毒桿菌的孢子可在土壤中發現，並且可在不適當滅菌及家用罐頭封裝食物容器中生長，其引起許多案例的肉毒桿菌病。肉毒桿菌的影響，典型會在食用被肉毒桿菌群落或孢子所感染的食物18至36小時後顯現。此肉毒桿菌毒素可明顯不減弱地通過腸襯裡，而攻擊周圍運動神經。肉毒桿菌毒素之麻醉症狀病程可由行走、吞嚥、言語困難，及因呼吸肌肉困難而死亡。

肉毒桿菌A型毒素(botulinum toxin type A, "BoNT/A")是對人類已知最致死之自然生物性神經毒素。在小鼠中肉毒桿菌A型血清型毒素(純化自神經毒素複合物)之LD₅₀約50兆分之一克。一單位(U)的肉毒桿菌毒素係定義為腹膜內

五、發明說明 (4)

注射至每18-20克之母Swiss Webster小鼠中的LD₅₀。有七種免疫特異性的肉毒桿菌神經毒素血清型A、B、C₁、D、E、F、G之特徵已被描述，每一種都可被血清型特異的抗體中和而辨識。不同血清型的肉毒桿菌毒素在其攻擊的不同動物種間，其嚴重程度及引起的麻痺時間亦不同。舉例言之，BoNt/A已被認定在大鼠中量測其麻醉有效率是肉毒桿菌B型毒素(BoNT/B)的500倍。此外，BoNt/B已被認定在靈長類中劑量為480 U/kg時尚為非毒素，此約為BoNt/A LD₅₀的12倍。肉毒桿菌毒素明顯和膽鹼激素性(cholinergic)運動神經結合具高親合力，可移位至神經而阻斷乙醯膽鹼的釋放。

肉毒桿菌毒素已被臨床使用於治療特徵為骨骼肌過動之神經肌肉疾病。BoNt/A已被美國食物與藥品管理准許用於治療臉痙攣、斜視及半臉痙攣。非A血清型之肉毒桿菌毒素血清型明顯具較低功效，及/或與BoNt/A相比活性期較短。肉毒桿菌毒素，如BoNt/A對肌肉內的臨床功效可被紀錄持續數小時。因此，大多數，若非全部，的肉毒桿菌毒素經肌肉內注射，在注射的一天內可產生顯著的肌肉麻痺，如由小鼠數位誘拐紀錄(Digit Abduction Score, (DAS))所量測得的現象是重要被注意的。Aoki K. R., Preclinical Update on BOTOX (Botulinum Toxin Type A)-Purified Neurotoxin Complex Relative to Other Botulinum Toxin Preparations, Eur J. Neur 1999, 6 (suppl 4): S3-S10。典型自肌肉內單一注射BoNt/A症狀緩解的時程平均約3個月。肉毒桿菌毒素，

五、發明說明 (5)

包含肉毒桿菌A型毒素，在活體內生物活性具減少之週期者正申請專利中，其專利案號為09/620840，此申請案併於此，作為參考。

雖然所有血清型的肉毒桿菌毒素都明顯抑制神經傳導物質乙醯膽鹼於神經肌肉接合點的釋放，但它們藉著影響不同之神經分泌蛋白質及/或在不同部位切裂這些蛋白質。舉例言之，肉毒桿菌A及E型毒素切裂25千道耳吞(kD)突觸相關蛋白(25 kiloDalton synaptosomal associated protein, (SNAP-25))，但它們的對此蛋白質的目標乃為不同的胺基酸序列。BoNT/B、D、F及G作用於胞囊相關蛋白(vesicle associated protein, VAMP，亦稱為辛納普托布凡(synaptobrevin)，而每種血清型都於不同位置切列此蛋白。最後，肉毒桿菌C₁型毒素(BoNT/C₁)已被證實可同時切裂辛泰素(syntaxin)及SNAP-25。這些活性機制上的不同，可能會影響其相關之效力及/或不同肉毒桿菌毒素血清型的活性時程。

無論何種血清型，麻醉毒素的分子機制顯示為相似的，且與至少三個步驟或階段相關。在方法的第一個步驟中，毒素經由H鏈與細胞表面接受子的特異性交互作用，高親合力地結合至目標神經的前突觸(presynaptic)膜：此接受子被認為對不同血清型的肉毒桿菌毒素或破傷風毒素為不同的。此H鏈的羧端段，H_C，顯示出毒素對鎖定細胞表面目標是重要的。

在第二個步驟中，毒素跨越中毒細胞的細胞膜。毒素首

五、發明說明 (6)

先經由接受子調節的細胞內攝作用而自細胞吸入，及形成一包含毒素的內胞囊(endosome)。此毒素接著自內胞囊逸出至細胞質。最後一個步驟被認為由H鏈的胺基端段，H_N，所調節，其觸發毒素因應pH約5.5或更低時，構形上的改變。內胞囊已知可控制質子幫浦，其會降低內胞囊內的pH值。此構形上的轉換在毒素中可暴露出水性殘基，而允許毒素嵌入在內胞囊膜裡，然後毒素再從內胞囊膜位移至細胞內膜。

肉毒桿菌毒素活性機構的最後步驟，顯示出其與L鏈裂解關鍵性細胞內外泌作用之蛋白質相關。整體肉毒桿菌與破傷風毒素的活性包含於全毒素(holotoxin)的L鏈裡：此L鏈是一鋅(Zn⁺⁺)內胜肽酶(endopeptidase)，此胜肽酶係選擇性切裂和辨識及停靠包含神經傳導之胞囊與細胞膜的細胞質表面必要蛋白質，並使此胞囊與細胞膜融合。破傷風神經毒素、肉毒桿菌毒素B、D、F及G可引起一種突觸膜(synaptosomal membrane)蛋白質，辛納普托布凡(亦稱為胞囊相關蛋白，VAMP)的分解。大部分呈現在突觸胞囊的細胞質表面VAMP會被這些切裂事件中的任何一個所移除。每一個毒素可特異性切裂不同鍵結。

所有已知的七種肉毒桿菌毒素血清型而言，肉毒桿菌毒素蛋白質的分子量約為150 kD。有趣的是肉毒桿菌毒素是以包含150 kD肉毒桿菌毒素與非毒性蛋白質所成的複合物形式，而自肉毒桿菌中釋放。因此，BoNt/A複合物可被肉毒桿菌以900 kD、500 kD與300 kD形式製造。BoNT/B與C₁

五、發明說明(7)

顯示出只以500 kD複合物形式製造。BoNT/D則可以300 kD與500 kD複合物形式製造。最後，BoNT/E與F只接近以300 kD複合物形式製造。此複合物(亦即分子量大於150 kD)據信為包含非毒性血球凝集素(hemagglutinin)蛋白質及非毒性非血球凝集素(nonhemagglutinin)蛋白質。此兩種非毒性蛋白質(與包含肉毒桿菌毒素分子相關的神經毒素複合物一起)可提供穩定性並抵抗肉毒桿菌毒素分子的變性作用，及當毒素被攝取時，保護其抵抗消化性酸。此外，較大的(大於150 kD分子量)肉毒桿菌毒素複合物，可能引起肉毒桿菌毒素自肌肉內注射肉毒桿菌毒素複合物時，較慢速率的擴散。

在體外的研究已指出，肉毒桿菌毒素可在腦幹組織的初級細胞培養中，抑制由鉀陽離子誘導之釋放乙醯膽鹼及正腎上腺素。此外，肉毒桿菌毒素可在脊髓神經細胞初級細胞培養中，抑制喚起釋放甘胺酸及麩胺酸之作用，已被報導，以及在腦突觸中，製備之肉毒桿菌毒素皆抑制神經傳導物質乙醯膽鹼、多巴胺、正腎上腺素，CGRP及麩胺酸的釋放。

BoNt/A可由在發酵器中建立及培養肉毒桿菌，再依已知程序收穫及純化發酵混合物而獲得。所有的肉毒桿菌毒素血清型首先以無活性單一鏈蛋白質合成，其必須被蛋白酶切裂或切刻成神經活性。製造肉毒桿菌A及G型毒素的細菌株擁有內生性蛋白酶，血清型A及G因此可自細胞培養中主要地獲得其活性型式。相反的，肉毒桿菌C₁、D及E型毒素

五、發明說明 (8)

由非蛋白分解(nonproteolytic)株所合成，故當其從培養中獲得時典型為非活性。血清型B及F皆可由蛋白分解及非蛋白分解株所製造，因此其可以活性或非活性型式而獲得。然而，即使由蛋白分解株所製造，舉例言之，BoNt/B血清型只切裂毒素產物的一部份。精確的切刻比未切刻分子比例依靠著培養長度及溫度。因此，舉例言之，任何製備BoNt/B毒素的某些比例可能為非活性，擔負了已知BoNt/B和BoNt/A相比為顯著較低效力的責任。臨床製備中，非活性肉毒桿菌毒素分子的存在，貢獻了製備中蛋白質總量，其已被連結以增加抗體反應，但不幫助其臨床效能。此外，經肌肉內注射，在相同劑量層次BoNt/B已知比BoNt/A活性具較短時程及效力較小。

BoNt/A已被報導用於以下的臨床配置：

- (1) 每肌肉(複數肌)內注射約75-125單位的BOTOX®¹以治療斜頸症(cervical dystonia)(1：自Allergan, Inc., of Irvine, California之下的商標名BOTOX®獲得)；
- (2) 每肌肉內注射5-10單位的BOTOX®以治療眉間紋(glabellar lines)(額皺紋)[肌肉內注射入鼻眉肌(procerus muscle) 5單位，及肌肉內注射入皺眉肌(corrugator supercilii muscle) 10單位]；
- (3) 括約肌內(intrasphincter)注射入恥骨直腸肌(puborectalis muscle)約30-80單位的BOTOX®以治療便秘；
- (4) 靠於上眼瞼側跗骨眼輪匝肌(lateral pre-tarsal

五、發明說明 (9)

orbicularis oculi)及下眼瞼的側跗骨眼輪匝肌的每條肌肉中肌肉內注射約1-5單位的BOTOX®以治療眼痙攣症(blepharospasm)；

- (5) 於眼外肌(extraocular muscle)中肌肉內注射介於約1-5單位的BOTOX®以治療斜視(strabismus)，此注射量的變化決定於被注射肌肉的尺寸及欲被麻醉的肌肉大小(亦即欲屈光校正量)
- (6) 為治療上肢痙攣產生的中風(spasticity following stroke)而肌肉內注射BOTOX®入五條不同上肢屈肌：
- (a) 屈指深肌(flexor digitorum profundus)：7.5 U至30 U
 - (b) 屈指淺肌(flexor digitorum sublimis)：7.5 U至30 U
 - (c) 尺側曲腕肌(flexor carpi ulnaris)：10 U至40 U
 - (d) 橈側曲腕肌(flexor carpi radialis)：15 U至60 U
 - (e) 肱二頭肌(biceps brachii)：50 U至200 U。

指出的五條肌肉在相同療程中皆已被注射，故病人在每個療程裡，上肢屈肌接受了90 U至360U肌肉內注射的BOTOX®。

BoNt/A治療多種臨床狀態的成功，引起了對其它肉毒桿菌毒素血清型的興趣。對兩種商業上可獲得的BoNT/A製備(BOTOX®及Dysport®)及BoNT/B與F製備(皆可自Wako Chemicals，日本獲得)的研究已完成了測定前臨床(preclinical)局部肌肉衰弱之效力、安全性及抗體力。注射肉毒桿菌毒素製備入右腓腸肌頭部(head of the right

五、發明說明 (10)

gastrocnemius muscle)(0.5至200.0 units/kg)，且使用小鼠數位誘拐紀錄分析(mouse digit abduction scoring assay, DAS)肌肉衰弱。自劑量反應曲線計算ED₅₀值。給予外加的小鼠肌肉內注射以測定LD₅₀值。計算LD₅₀/ED₅₀值作為治療索引。分群小鼠的後肢分別接受BOTOX[®]的注射(5.0至10.0 units/kg)或BoNt/B (50.0至400.0 units/kg)，再測定其肌肉衰弱及水消耗之增加，後者作為假定乾口模型。依每月肌肉內注射入兔子內(BoNt/B為2.0或8.7 Units/kg及BOTOX[®]為3.0 Units/kg)估計其抗體力。全部血清型的肌肉衰弱尖峰值及時程為劑量相關性。DAS的ED₅₀值(units/kg)如下： BOTOX[®]：6.7，Dysport[®]：24.7，BoNt/B：11.8至244.0，BoNt/F：4.3。BOTOX[®]比BoNt/B或BoNt/F具有較長之活性期。在小鼠中，即使BoNt/B在肌肉衰弱上效力較低，注射BoNt/B比BOTOX[®]具較大的水消耗度。在四個月的注射中，4隻中有2隻(當處理1.5 ng/kg)及4隻中有4隻(當處理6.5 ng/kg)兔子產生抗BoNt/B的抗體。在分開的研究中，9隻中有0隻以BOTOX[®]處理的兔子顯示出抗BoNt/A的抗體。DAS的結果指出BoNt/A之相對尖峰效力與BoNt/F相當，且BoNt/F大於BoNt/B。考慮效力的時程，BoNt/A大於BoNt/B，且BoNt/B效力的時程大於BoNt/F。如治療索引值所示，此兩種BoNt/A商業製備(BOTOX[®]與Dysport[®])是不同的。在後肢注射BoNt/B觀察到水消耗行為的增加，指出了此種血清型進入小鼠系統循環的臨床顯著值。本結果亦指出了為達與BoNt/A相同效力，必須增加被測試的其他血清

五、發明說明 (11)

型的劑量。增加的劑量包含安全性。更進一步，在兔子中，血清型B比BOTOX®更具抗體性，可能因為欲達有效劑量而注射了較高的BoNt/B蛋白量。

破傷風神經毒素主要作用在中央神經系統，而肉毒桿菌毒素作用在神經肌肉接合點：兩者都靠抑制乙醯膽鹼自被影響神經的軸突釋放至突觸，而引起麻醉。被影響神經的麻醉效力是長效的，且直到最近才被認為是不可回復的。破傷風神經毒素已知存在一種免疫獨特血清型。

乙醯膽鹼

哺乳動物神經系統典型上，每種神經只釋放單一種型式的小分子神經傳導物質。此神經傳導物質乙醯膽鹼由腦中許多區域的神經所分泌，但特別是由運動皮質的大錐狀細胞，由基底核的許多不同神經，由支配骨骼肌的運動神經，由自律神經系統（交感與副交感皆有）的結前（preganglionic）神經，由副交感神經系統的結後（postganglionic）神經，及由一些交感神經系統的結後神經所分泌。本質上，只有毛髮豎立肌（piloerector muscle）汗腺的結後交感神經纖維，及一些血管是膽鹼性，且大多數交感神經的結後神經乃釋放神經傳導物質正腎上腺素。在絕大多數的例子中，乙醯膽鹼具興奮效力。然而，乙醯膽鹼亦已知為在某些周圍副交感神經末端具抑制效力，如迷走神經抑制心臟。

交感神經系統或副交感神經系統，擇一將自律神經系統之訊號傳遞至身體。交感神經系統的結前神經從位於脊柱

五、發明說明 (12)

中間偏側間(intermediolateral horn)的結前交感神經細胞體延伸。結前交感神經纖維，自細胞體延伸，與位於椎後(paravertebral)交感神經結或椎前(prevertebral)神經結擇一之結後神經形成突觸。既然交感與副交感神經系統的結前神經皆為膽鹼性，應用乙醯膽鹼於神經結將同時興奮交感與副交感結後神經。

乙醯膽鹼活化兩種接受子，蠅蕈鹼性(muscarinic)及膽鹼性(nicotinic)接受子。蠅蕈鹼性接受子可在所有被副交感神經系統的結後神經影響細胞中發現，同時也在被交感神經系統結後膽鹼性神經刺激的細胞中發現。膽鹼性接受子在交感與副交感的結前及結後間突觸中發現。膽鹼性接受子亦在許多骨骼肌肉纖維的神經肌肉接合點的膜中發現。

當小，清楚，細胞內胞囊和前突觸神經細胞膜融合時，乙醯膽鹼自膽鹼性神經中釋放。廣大多樣性的非神經分泌細胞，如腎上腺髓質(亦為PC12細胞株)及胰島細胞分別自大的緊核胞囊釋放兒茶酚胺(catecholamines)及胰島素。PC12細胞株是複製自大鼠嗜鉻性細胞瘤(pheochromocytoma)細胞，其廣泛使用於研究交感神經及腎上腺(sympathoadrenal)發育的組織培養模型。肉毒桿菌毒素在體外抑制兩種型式的化合物自兩種細胞型式的釋放，經通透(如電穿孔)或直接注射毒素進入切除神經(denervated)細胞。肉毒桿菌毒素已知可阻斷神經傳導物質麩胺酸自皮層突觸細胞培養的釋放。

神經肌肉突觸在骨骼肌中由軸突延伸到肌肉細胞而形成

五、發明說明 (13)

。經神經統的訊號，傳遞源於末端軸突的活動勢(action potential)，其靠著活化離子通道並引起神經傳導物質乙醯膽鹼自神經內突觸胞囊的釋放，舉例言之，如於神經肌肉接合點的運動端平面(endplate)。乙醯膽鹼穿越胞外空間，並與肌肉端平面表面的乙醯膽鹼接受子結合。當足夠的結合一發生，肌肉細胞的活動勢便引起特異膜離子通道改變，而引起肌肉收縮。乙醯膽鹼接著自肌肉細胞釋放，並被胞外空間的膽鹼酯酶(cholinesterases)代謝。此代謝物可循環回端軸突以製造更多乙醯膽鹼。

如上所討論，治療受傷害肌肉的方法仍不足。而需要進步的方法以治療肌肉傷害。

發明概要

依照本發明，一種有效治療受傷害肌肉之方法包含在體內步驟局部施予治療有效量的神經毒素或受至傷害肌肉附近。此神經毒素的作用在於提供受傷害肌肉暫時性的化學性切除神經(chemodenervation)，並減少肌肉收縮。本發明的目的在於治療且容易痊癒，並加速受傷害肌肉功能的回復。此受傷害的肌肉，舉例言之，可能為使用過度的肌肉。在一實施例中，施予神經毒素於肌肉內或皮下。在另一實施例中，在進行施予神經毒素及/或接著物理治療及/或外科手術。

進一步根據本發明，在肌肉受傷後立即或於可施行時立刻施予神經毒素。在一實施例中，神經毒素係至少在受傷害肌肉修復過程時期1及/或時期2有效固定或實質上固定

五、發明說明 (14)

受傷害之肌肉。

根據本發明，神經毒素包括一目標成分，一治療成分，及一移位成分。該目標成分可結合一前突觸運動神經。在一實施例中，該目標成分可包含一酪酸菌(butyricum)毒素、破傷風毒素或肉毒桿菌A、B、C₁、D、E、F、G型毒素或其變化物之重鏈羧端段。該治療成分可干擾或調節神經傳導物質自神經的釋放或過程。在一實施例中，該治療成分包含一酪酸菌毒素、破傷風毒素或肉毒桿菌A、B、C₁、D、E、F、G型毒素或其變化物之輕鏈。該移位成分可調節轉換至少一部份的神經毒素，如該治療成分，進入目標細胞的細胞質。在一實施例中，該移位成分可包含一酪酸菌毒素、破傷風毒素或肉毒桿菌A、B、C₁、D、E、F、G型毒素或其變化物之胺基端段。

更進一步根據本發明，此神經毒素係為肉毒桿菌A、B、E及/或F型毒素。在一較佳實施例中，此用於治療受傷害肌肉的神經毒素係為肉毒桿菌A型毒素。事實上，使用肉毒桿菌A型毒素為較佳係因其為商業上可獲得，並已知為臨床使用，且依此討論的，根據本發明可成功應用於治療受傷害之肌肉。使用約0.1 U/kg至約30 U/kg的肉毒桿菌A型毒素及從約1 U/kg至約150 U/kg的肉毒桿菌B型毒素係於根據本發明所揭露之方法實行範圍內。考慮其它肉毒桿菌毒素血清型(包括E及F型毒素)，如於此所建立的，其所使用之U/kg劑量係落於約0.1 U/kg至約150 U/kg的範圍內。

更進一步根據本發明，該神經毒素可為重組製造之。

五、發明說明 (15)

本發明詳細之實施例為一用於在體內治療(如促進痊癒)受傷害肌肉的方法，其係局部施予一治療有效量之肉毒桿菌毒素於受傷害之肌肉，並由此治療受傷害之肌肉。該肉毒桿菌毒素可為肉毒桿菌A型毒素。顯著地，本發明亦包含用於在體內治療因受傷害肌肉的疼痛，其係局部施予一治療有效量之肉毒桿菌毒素於受傷害之肌肉，並由此減輕因肌肉傷害所引起的疼痛。

在此所描述的每個特徵及兩個或更多特徵之每個組合，係包含於本發明所提供之範圍內，其特徵包含不互相矛盾之組合。

定義

以下提供及應用於此發明之定義。

"約"指近似或接近並列於此之上下文關係數字值或範圍，意味列或請求於此之數字值或範圍的±10%。

"重鏈"指桿菌(clostridial)神經毒素之重鏈。其較佳具約100 kDa之分子量，可能在此以H鏈或H代表。

"H_N"指一自肉毒桿菌毒素H鏈衍生之片段(較佳具約50 kDa之分子量)，其近似相等於H鏈的胺基端段，或在完整H鏈中之相應部份。據信包含天然或野生桿菌神經毒素部份與L鏈穿越細胞內細胞內膜相關。

"H_C"指一自肉毒桿菌毒素H鏈衍生之片段(約50 kDa之分子量)，其近似相等於H鏈的羧端段，或在完整H鏈中之相應部份。據信其為免疫性，並包含天然或野生桿菌神經毒素部份，與高親合力結合至前突觸運動神經相關。

五、發明說明 (16)

"受傷害之肌肉"包括一使用過度、破裂或拉張肌肉，亦即肌肉挫傷、裂傷、局部缺血或破裂。

"輕鏈"指桿菌神經毒素之輕鏈。其較佳具約50 kDa之分子量，可能在此以L鏈、L或桿菌神經毒素之蛋白分解區域(胺基酸序列)代表。該輕鏈據信為當其釋放至目標細胞的細胞質時為有效之神經傳導物質釋放抑制子。

"局部施予"指直接於一動物體施予一醫藥在或至鄰近位置，該位置為需要醫藥生物效能者。

"神經毒素"指一化學實體，其可干擾或調節至少神經之一個功能。該"神經毒素"可自然發生或人工製造。進一步的，該"神經毒素"可為一小分子，一大分子，一多胜肽酶，一偶合多胜肽酶或其混合物。

"變化物"指一化學實體，其係細微不同於其根源化學實體，但仍具生物活性。此變化物之生物活性可為實質上相同或較其根源更加。舉例言之，一肉毒桿菌毒素輕鏈之變化物具至少一胺基酸被取代，修改，刪除或加入，可能具有相同或較佳防止神經傳導物質自胞囊中釋放。此外，變化物的生物活性可能會減低。舉例言之，一肉毒桿菌A型毒素之輕鏈變化物具有一白胺酸為基礎區域移除，可能比其根源(或原生)肉毒桿菌A型毒素輕鏈具較短的生物持續性。

發明描述

在廣泛的實施例中，根據本發明之一有效治療受傷害肌肉之方法可包含局部施予一治療有效量之肉毒桿菌毒素至

五、發明說明 (17)

受傷害肌肉的步驟。較佳的，該受傷害之肌肉係為一使用過度肌肉。

一過度使用之骨骼肌傷害可分類為變形(shearing)傷害。在變形傷害中，不只肌肉纖維，連肌鞘(mysial sheaths)亦破裂。幾乎立即就在肌肉傷害後，肌肉修復步驟便開始。此修復變形傷害步驟可分為三時期。

時期1為破壞期，其特徵為血腫的形成，肌纖維壞死及發炎細胞反應。在使用過度後，相反為健康肌肉的破裂位置常發生於靠近其遠端肌肉肌腱接合點(MTJ)。此破裂的肌纖維收縮，並在殘枝形成一隙縫。因骨骼肌富含血管，自破裂血管出血係不可逸出的，而其隙縫變成被血腫填滿，並在其後被癒組織移除。在機械力破裂整個肌纖維的變形傷害中，損害了肌纖維的細胞膜，並使殘枝端的肌質漿(sarcoplasm)打開。因為肌纖維是非常長且弦狀之細胞，壞死位置沿著破裂肌纖維的全長延伸。血管亦在變形傷害破裂：因此，帶血發炎細胞立刻增加接近受傷位置並引起發炎。時期1自受傷後持續約2至3天。

時期2為修復期，其由壞死組織的巨噬作用，肌纖維的再生，癒結締組織的產生，及微血管向內生長所組成。受傷害肌肉組織再生作用的關鍵步驟在於受傷區域的血管生成作用。血管供應的回復對受傷肌肉的再生作用是必須的。新的微血管自殘存的大血管中長出，並小心穿透受傷害區域的中間。這些新的微血管幫助提供再生區域足夠的氧氣供應。

五、發明說明 (18)

時期3為改型期，其由再生肌纖維的成熟作用，癥組織的收縮及重新組織，及修復肌肉功能的回復所組成。時期2(修復)及3(改型)通常同時發生且在時期1後持續約2天至約6星期。

在本發明之一實施例中，神經毒素係局部施予，較佳係肌肉內注射，以固定受傷害的肌肉以促進痊癒。根據本發明所揭露之局部施予一神經毒素亦可減少因肌肉傷害所引起的痛覺。較佳的，係在受傷後立即或靠近其後施予神經毒素。在一較佳實施例中，神經毒素係在破壞期(時期1)有效固定受傷害的肌肉以預防肌肉的再次破裂。

為不希望限制實施本發明於任何特定的理論機構，據信修復時的移動及/或此移動幫助改型期引起更快速及強烈微血管向內生長至受傷害區域，如更好的肌肉纖維再生及辨位。因此，在一實施例中，在修復期(時期2)及/或改型期(時期3)時，缺乏神經毒素的固定作用。在一更佳實施例中，在時期1施予神經毒素並有效固定受傷害的肌肉，但在修復作用的時期2及3並不施予。舉例言之，若在受傷後立即注射神經毒素，較佳為肌肉內，神經毒素於施予後的約3天內固定受傷害肌肉係較佳的。另，神經毒素可只在病人在基礎運動受傷害肌肉感到些微或不痛時，具其固定作用。當達到此臨界點，病人可鼓勵其開始活動，並進行移動。

在本發明之另一實施例中，神經毒素係全在時期1-3及其後的肌肉受傷恢復期皆有效固定受傷害的肌肉。

五、發明說明 (19)

神經毒素，如某些肉毒桿菌毒素，需要少於約一天至約七天以顯現顯著的臨床肌肉麻痺功能，及/或該肌肉麻醉功能可在注射後持續數月，皆在本發明之範圍內，如此神經毒素可用於治療相對嚴重或長期肌肉傷害或為適當痊癒的長期肌肉固定作用。

在一廣泛的實施例中，神經毒素係為一神經肌肉阻斷劑。表1顯示一神經肌肉阻斷劑及其活動潛力位置之非限定表。在一實施例中，神經肌肉阻斷劑具固定肌肉的能力，較佳為受傷害的肌肉，施予至少約5天，且較佳為至少約3天以治療受傷害的肌肉。在本發明之較佳實施例中，該神經毒素係為肉毒桿菌毒素，因其習知的使用及肉毒桿菌毒素的臨床安全性，如肉毒桿菌E型毒素於治療肌肉疾病，如肌肉痙攣。在本發明一特別較佳實施例中，特別是嚴重的或第三及肌肉傷害，局部施予之肉毒桿菌毒素為肉毒桿菌E型毒素。肉毒桿菌A型毒素亦可用於這些實施例中。

五、發明說明 (20)

表 1

化合物	相應於NMJ的活性位置	醫藥分類
乙醯膽鹼脂酶誘導子	突觸	ACh脂酶誘導子
烏頭素(Aconitine)	前突觸	鈉通道活化子
腺調節素(自蛙 Phyllomedusa Bicolor而來)	前突觸	腺苷酸接受子調節子
腺苷酸激動劑	前及後突觸	腺苷酸
腺苷酸拮抗劑	前及後突觸	腺苷酸
腺苷酸	前及後突觸	腺苷酸
腎上腺素激導素	前突觸	Alpha型腎上腺素激導素
類毒素-A	後突觸	AChR激動劑
抗癲癇素	CNS	抗癲癇素
反意識	前及後突觸	特異蛋白質之 反意識技術 釋放神經傳導 物質之重要訊息 接受子製造
抗焦慮藥	CNS	抗焦慮藥 抗癲癇素
阿塔寇寧(Atacurim)	後突觸	AChR拮抗劑 非極性肌肉放鬆劑

五、發明說明 (21)

阿塔寇寧必司雷特 (Atacurim besylate) (Tracurium)	後突觸	AChR拮抗劑 非極性肌肉鬆弛劑
巴客洛芬(Baclofen) (Lioresal .RTM., Geigy; Intrathecal, Medtronic; Neurological; generic, Athena, Biocraft, Warner Chilcott) 細菌，植物及真菌 產物	前突觸	GABA類似物
蛙毒	前突觸	鈉通道活化子
苯甲基哌啶	突觸溝	ACh酯酶抑制 子(非傳統性)
植物性神經毒素	前及後突觸與突觸溝	多樣性
蛇毒-β (β-BuTX)	前突觸	PLA2及電壓敏感 性鉀通道阻斷子 蛇毒來自Bungarus multicinctus
標辟菲坎(Bupivacain)	前及後突觸	局部麻醉肌肉毒素
卡普脫皮歐 (Captopril)(Capoten .RTM., Squibb; Capzide .RTM., Squibb)	前突觸	抗血管緊張 ACE抑制子 鋅內胜肽酶抑制子
膽鹼 + 乙烯轉移 酶抑制子	前突觸	CAT抑制子
膽鹼酯酶抑制子	突觸溝	ACh酯酶抑制子

五、發明說明 (22)

甲藻毒素	前突觸	鈉通道
椎毒素MI (alpha 椎毒素)	後突觸	AChR拮抗劑
椎毒素-.mu. GIIIA (mu-CT)		Na ⁺ 通道阻斷子
椎毒素-.OMEGA. GVIA (omega-CT)		只在神經的Ca ²⁺ 通 道阻斷子
寇瑞爾(Curare)	後突觸	AChR拮抗劑
丹綽連(Dantrolene) 鈉(Dantrium, P&G)	後突觸	非極性骨骼肌鬆弛劑
蝙蝠葛鹼	後突觸	AChR拮抗劑
溴化十甲季銨	前突觸	神經結阻斷子
樹狀毒素	前及後突觸	鉀離子通道阻斷子
二胺基吡啶 (3-DAP)	前突觸	肉毒桿菌麻醉逆轉
安定(diazepam)	CNS	Anxiolytic
荳撒寇寧 (Doxacurim)氯 (Nuromax .RTM., Burroughs wellcome)	後突觸	AChR拮抗劑
荳索茹比新 (Doxorubicin) (Adriamycin, Adria; Rubex, immunex; Cetus Onoclogy)	後突觸	肌毒素 化學性肌切除

五、發明說明 (23)

耶比蓓提啉 (Epibatidine)二氫化氯	後突觸	AChR激動劑
菲而貝美特 (Felbamate)(Felbatol, Carter-Wallace lic to Schering-Plough)	前突觸 CNS	抗癲癇劑
佛落撒麥新 (foroxymithine)	前突觸	血管緊縮素I轉變 酵素抑制子
卡八賓停(Gabapentin) (Neurontin, Parke-Davis)	前突觸 CNS	GABA類似物
沒食子醯胺	後突觸	AChR拮抗劑
格瑞毒素 (Grayantoxin)	前突觸	鈉通道活化子
六氫化吡庚因乙醯 胺及其他化學類	前突觸	ACh釋放子
修伯新(Huperzine)A	突觸溝	ACh酯酶抑制子
昆蟲毒		
離子通道阻斷子	前及後突觸	通道阻斷子
離子通道刺激物	前及後突觸	通道刺激物
蛛毒素- α	前突觸	鉀紫幻視 黑寡婦蜘蛛毒素
里斗嵌(Lidocaine)、 普魯卡因(procaine)、 美比卡嵌(mepivacain) 等	前突觸	局部麻醉

五、發明說明 (24)

李諾皮啉(Linopirdine) 前突觸
(DuP 996,
Dupont Merck)

ACh釋放促進子

李佛毒素(Lophotoxin) 後突觸
及其類似物

AChR拮抗劑
不可回復的

海洋自然產物

美索卡貝摩
(Methocarbamol)
(Robaxin, Robins co.)

CNS降低

美西里卡寇呢啉
(Methyllycaconitine)

肌肉鬆弛劑

麥菲寇寧 後突觸
(Mivacurium) 氯
(Mivacro .RTM.,
BW-BW1090U,
Burroughs Wellcome)

AChR拮抗劑
非極性肌肉鬆弛劑

修飾之桿菌毒素 前突觸

ACh釋放抑制子

抗NMJ物單株抗體

接受子，agrin，神經
傳導物質，細胞膜物，
未活化酵素等

草毒素激動劑及 前及後突觸
拮抗劑

草毒素
CNS激動劑及拮抗劑

泥歐撒西毒素 前突觸
(Neosaxitoxin)

鈉通道阻斷子

泥歐蘇如卡毒素
(Neosurugatoxin)

自主結AChR阻斷子
(對NMJ無效)

神經肌肉阻斷劑 後突觸

AChR拮抗劑
AChR去極性

五、發明說明 (25)

自爬蟲類，昆蟲及 其他來源的神經毒素	前及後突觸與突觸溝	多樣性
攀扣柔寧 (Pancuronium) 溴(Organon)	後突觸	AChR拮抗劑 非極性肌肉鬆弛劑
攀扣柔寧 (Pancuronium)-3-OH 代謝物 (Organon)Papverine HCl (30 mg/ml)	後突觸	AChR拮抗劑 非極性肌肉鬆弛劑 平滑肌鬆弛劑
飛蘇司提格寧 (Physostigmine)及 類似物	突觸溝	ACh酯酶抑制子
哌特扣柔寧 (Pipercuronium) (Arduan, Organon)	後突觸	AChR拮抗劑 非極性肌肉鬆弛劑
前突觸神經端接受子	前突觸	在神經端任何外加或 神經內接受子
短神經毒素alpha	後突觸	AChR拮抗劑
β -蛇毒 (β -BuTX)	前突觸	蛇毒來自 Bungarus multicinctus
琥珀酸氯 (Anectine, Burroughs Wellcome)	後突觸	AChR拮抗劑 非極性肌肉鬆弛劑
破傷風毒素	前突觸	EAA釋放抑制子
破傷風毒素傳送子	前突觸	
四氫胺基吡啶(THA)	突觸溝	ACh釋放抑制子

五、發明說明 (26)

四達克斯毒素 (Tetrodoxtoxin)	前及後突觸	鈉通道阻斷子
提阿卡賓(Tiagabine) (Novo Nordisk)	CNS	抗癲癇 GABA攝取抑制子
轉麩胺酸酶抑制子 或防止誘導	前及後突觸	酵素
非力寧(Valium)		diazepam CNS Anxiolytic
非扣柔寧 (Vecuronium) (Norcuron, Organon)	後突觸	AChR拮抗劑 非極性肌肉鬆弛劑
非扣柔寧 (Vecuronium)-3-OH 代謝物(Organon)	後突觸	AChR拮抗劑 非極性肌肉鬆弛劑
非若特瑞定 (Veratridine)	前突觸	鈉通道活化子
非卡貝啉(Vigabatrin) (Sabril, Marion Merrell CNS Dow)	前突觸	抗癲癇 GABA代謝抑制子(不可 回復性)
非撒迷扣(Vesamicol) 及具有相同機制的 其他藥	前突觸	ACh胞囊傳送抑制子
鋅內胜肽酶酶及其他 靠肉毒桿菌毒素或 破傷風毒素運送子 傳遞的蛋白酶	前突觸	酵素減少神經 傳導物質釋放

五、發明說明 (27)

在一廣泛之實施例中，神經毒素可包含一目標成分，一治療成分，及一移位成分。該目標成分可結合一前突觸運動神經。在一實施例中，該目標成分可包含一酪酸菌(butyricum)毒素、破傷風毒素或肉毒桿菌A、B、C₁、D、E、F、G型毒素或其變化物之重鏈羧端段。在一較佳的實施例中，該目標成分可包含肉毒桿菌A型毒素的羧端段。

該治療成分本質上可干擾或調節神經傳導物質自神經的釋放或過程。在一實施例中，該治療成分包含一酪酸菌毒素、破傷風毒素或肉毒桿菌A、B、C₁、D、E、F、G型毒素或其變化物之輕鏈。在一較佳實施例中，該治療成分可包含具短生物持續，如小於約5天，較佳為小於約3天，之肉毒桿菌毒素型之輕鏈。較佳地，該輕鏈可為肉毒桿菌E或F型毒素之輕鏈。可選擇地，該輕鏈可為肉毒桿菌A型毒素之輕鏈。

該移位成分可調節轉換至少一部份的神經毒素，如該治療成分，進入目標細胞的細胞質。在一實施例中，該移位成分可包含一酪酸菌毒素、破傷風毒素或肉毒桿菌A、B、C₁、D、E、F、G型毒素或其變化物之胺基端段。在一較佳實施例中，該移位成分包含肉毒桿菌A型毒素重鏈的胺基端段。

在一實施例中，該目標成分包含一肉毒桿菌E或F型毒素重鏈之羧端段，該治療成分包含肉毒桿菌E或F毒素之輕鏈，及該移位成分包含肉毒桿菌E或F毒素重鏈之胺基端段。在一較佳實施例中，此神經毒素包含一肉毒桿菌E型毒素。

五、發明說明 (28)

在另一較佳實施例中，神經毒素胞和一肉毒桿菌F型毒素。
在另一個實施例中，該神經毒素包含肉毒桿菌E或F型毒素。

在一實施例中，該目標成分包含肉毒桿菌A型毒素的重鏈羧端段，而該治療成分包含肉毒桿菌A型毒素之輕鏈，及該移位成分包含肉毒桿菌A型毒素重鏈的胺基端段。在一較佳實施例中，本發明的該神經毒素包含肉毒桿菌A型毒素。一適合在此使用的肉毒桿菌A型毒素為BOTOX® (Allergan, Inc., Irvine, California)。

雖然本發明的神經毒素以固定而治療受傷害的肌肉，在一實施例中，該神經毒素也可施予至受傷害的肌肉以減輕疼痛及/或痙攣。在另一實施例中，該神經毒素也可固定受傷害的肌肉以減輕因受傷害的肌肉的疼痛。在一較佳實施例中，一神經毒素，舉例言之為肉毒桿菌E型毒素，或最佳為A型毒素被施予至使用過度之肌肉以固定該肌肉，及/或減輕因該肌肉的疼痛。

當然，一普遍熟悉醫藥之供應者可測定適宜的劑量及施予頻率以達到最適宜的臨床效果。此即，一普遍熟悉醫藥之人士可在適當時機施予適當量之神經肌肉阻斷劑，以有效固定受傷害之肌肉。該用於施用之神經毒素劑量視許多不同的因子而定，包含肌肉尺寸，及肌肉受傷的嚴重度。在一較佳實施例中，施予固定受傷害肌肉神經毒素的劑量不長於修復過程時期1之時程。在本發明的許多方法中，從約0.1 U/kg至約15 U/kg的肉毒桿菌A型毒素可施予至受傷

五、發明說明 (29)

害之肌肉。較佳地，約1 U/kg至約20 U/kg之肉毒桿菌A型毒素可被施予至受傷害的肌肉。使用自約0.1 U/kg至約30 U/kg之肉毒桿菌A型毒素及自約1 U/kg至約150 U/kg的肉毒桿菌B型毒素，皆在本發明揭露之施行方法的範圍內。考量其它肉毒桿菌血清型(包含E及F型毒素)，其U/kg之使用劑量如於此所建立的，落於自約0.1 U/kg至約150 U/kg之範圍內。

雖然肌肉內注射是施予之較佳途徑，其它局部施用之路徑是可獲得的，如皮下施予。

在另一廣泛之實施例中，根據本發明治療受傷害肌肉之方法進一步包含以下描述之其它步驟。採用這些其它步驟可在施用神經毒素步驟前、一起或後，較佳地於受傷害肌肉。舉例言之，本建議之治療使用過度肌肉包含使休息，冰敷數，壓迫及高舉。此四步驟(或程序)具有相同的目標。其減低破裂位置自破裂血管的出血。此將預防大型血腫的形成，大型血腫對再生的端癥組織的尺寸有直接衝擊。一小型血腫及細胞組織間水腫在破裂位置累積的限制，亦縮短肉芽組織(granulation tissue)局部缺血時程，此將依序加速再生作用。

其它加入的步驟可包含使用受傷害肌肉之治療。在一實施例中，該加入的步驟包括施予非類固醇抗發炎藥(nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)、治療性超音波、高比重氧、及在嚴重的傷害中，外科手術也可施予。NSAIDs應可作為一早期治療即應在受傷後立即開始。在

五、發明說明 (30)

復原早期短程使用NSAIDs可減少細胞發炎反應，並對受傷害肌肉的伸張或收縮無不利之影響。

在另一個實施例中，此加入的步驟包含使用治療性超音波。治療性超音波係廣泛被建議使用於治療肌肉使用過度。治療性超音波被視為可促進肌肉再生作用的增殖期。

在另一個實施例中，此加入的步驟包含使用高比重氧(hyperbaric oxygen)，在兔子中於修復早期使用高比重氧治療實質上可促進最後之結果。據信在其他哺乳動物中高比重氧治療，舉例如人類，可能有效於加速肌肉再生作用。

在另一個實施例中，此加入的步驟包含外科手術干涉。外科手術治療肌肉傷害應保留至最嚴重的病例，因為大部分的病例中，保守的治療已可達到良好的結果。外科手術治療只用在(1)大型肌肉內血腫，(2)很少或無催動肌(agonise)之第三級肌肉使用過度或破裂，及(3)第二級使用過度，若多於一半的肌肉鼓脹破裂。

本發明之另一個廣泛觀點，重組技術可用於製造至少一個神經毒素物。該技術包含自自然來源的DNA複製或合成之核苷酸序列獲得遺傳物質，其具一物，如治療、移位及/或目標成分之密碼。該遺傳構成物靠首先融合遺傳構成物與一複製載體，如噬菌體或質體，而編入宿主細胞用以放大。然後該複製載體插入至宿主內，較佳為大腸桿菌。接著該重組基因在宿主內之表現所產生的蛋白質可使用普遍的技術分離。該表現蛋白質可包含神經毒素全部三物。舉例言之，此表現蛋白質可包括肉毒桿菌E型毒素的輕鏈(該治

五、發明說明 (31)

療成分)，肉毒桿菌B型毒素之一重鏈，較佳係H_N(該移位成分)，及肉毒桿菌A型毒素之H_C，其係選擇性結合至運動神經。在一實施例中，此表現蛋白質可包括少於神經毒素的全部三物。在此例中，該物可使用此技藝中已知之技術化學性連結。

重組製造這些神經毒素有許多優點。舉例言之，自無氧桿菌族群中製造神經毒素之方法是累贅且耗時的，包括多步驟的純化程序，與許多蛋白質沉澱步驟、與延長及重複結晶毒素或層析管柱的許多階段其中之一相關。顯然地，產物的高毒性指定了此程序必須在嚴格的承載物(BL-3)中進行。在此醱酵作用中，此摺疊的單鏈神經毒素被內生性桿菌蛋白酶經一稱為切裂之步驟所活化。此關聯於自單鏈中移除近10個胺基酸殘基，以創造出一雙鏈型式，其中兩個鏈係經鏈內雙硫鍵共價連結。

此被切裂的神經毒素比位切裂型式具更多活性。切裂的量及精確位置隨細菌製造的毒素血清型而變化。單鏈神經毒素的不同，因此，切裂毒素的生產，導因於型的變化及由給予之菌株所產生蛋白裂解活性的量。舉例言之，大於99%之肉毒桿菌A型單鏈神經毒素被Hall A肉毒桿菌株所活化，而B及E型菌株產生之毒素則具較低量活性(0至75%依醱酵作用時間而定)。因此，高毒性之成熟神經毒素在商業製造神經毒素作為治療性神經毒素扮演重要之角色。

故，工程化的桿菌毒素的活性程度在製造這些材料時，是一重要之考量點。若神經毒素，如肉毒桿菌毒素及破傷

五、發明說明 (32)

風毒素可被表現、重組、在快速成長的細菌(如異質化之大腸桿菌細胞)具高生產之相對無毒性之單鏈(或具減低毒素之單鏈)，而可被安全、容易的分離並簡單轉化成全活性型式，將是一主要之進步。

當安全性為一最主要之考量，之前的工作集中在大腸桿菌表現及純化個別的破傷風毒素及肉毒桿菌毒素H及L鏈，這些個別的鏈本身為無毒性的，參看Li等人，Biochemistry 33:7014-7020 (1994)；Zhou等人，Biochemistry 34:15175-15181 (1995)，併於此作為參考。接下來的分開製造這些胜肽酶鏈，及在嚴格控制條件下H及L次單位可被氧化雙硫鍵結而結合，以形成神經麻痺性之雙鏈。

以下非限定的實例，係提供受傷害肌肉較佳地治療方法，及製造重組神經毒素，較佳係肉毒桿菌毒素。描述於實例4至8之製造重組肉毒桿菌毒素方法係由Dolly等人所揭示之國際專利申請號WO 95/32738所引起並相類似，併於此作為參考。

實例 1

治療破裂的二頭腱(Biceps Tendon)

肱二頭肌的破裂普遍發生於近端且與二頭之長頭相關。該肌肉可能在遠端插入橈骨觸破裂，但很少發生。最常見的，破裂發生於年齡大於40歲的成人，其有肩膀痛之長病史及次要的衝擊症狀。此時，肌腱變得磨損且虛弱，而終究局部或全部破裂。雖然，此破裂常因輕微的事件所引起。這些破裂通常與轉肌環帶(rotator cuff)破裂相關，特別在成

五、發明說明 (33)

人中。

一45歲男士在舉重盒後顯示出下臂腫脹。他報告了上臂突然的尖銳痛之病例，通常伴隨清晰可聞之折斷聲。這男士被診斷為肱二頭肌腱斷裂，並開始時期1之修復作用。該斷裂可被分類為中度第二級的使用過度。

以團塊(bolus)肌肉內注射自約0.1 U/kg至約25 U/kg之神經毒素入二頭肌以治療此病人。較佳此神經毒素係肉毒桿菌E及F型毒素，更佳係A型。施用獨特的劑量及頻率依不同因子而定，並由治療的醫生決定。進一步指示此病人休息及使用冰敷及壓迫二頭肌。在施予神經毒素約三天後，此病人可彎曲他的手臂。同時在約三天後，此病人感到發炎的減少，此係為病人進入修復作用時期2及3之信號。病人也感到顯著的疼痛減輕。局部施予自約10單位至約200單位之肉毒桿菌A型毒素也可使用於長效(2至4月)的肌肉固定及疼痛減輕。

實例2

伸肌破裂機制

膝蓋的伸肌破裂機制以兩種方式之一發生：在年輕病人中導因於突然或猛烈之力量(如跳躍、舉重)，及在較年長的病人中導因於相對輕微的力量。在每一個族群中，有可能已有先前的彎曲。影響較年長之病人典型係略為少活動及突然增加他們的活動量，或是具有已存在或共同存在如糖尿病、風濕性關節炎及其他系統性發炎疾病，或之前的膝蓋手術。

五、發明說明 (34)

一22歲女性足球運動員顯出無法伸長他的膝蓋。此病人也無法將伸長的腿舉起，但若她保持放一隻手在大腿上以保持膝蓋伸直，是可行走的。平面射線攝影顯出其膝蓋骨較正常位置為低。此病人被診斷為嚴重的四頭肌斷裂。

當測定此傷害係為嚴重(第三級)後，此病人同意進行修復性外科手術。在手術後，以團塊肌肉內注射自約0.1 U/kg至約25 U/kg之神經毒素(如約10至約400單位的肉毒桿菌A型毒素)入四頭肌以治療此病人。較佳此神經毒素係肉毒桿菌A型毒素。施用獨特的劑量及頻率依不同因子而定，並由治療的醫生決定。進一步指示此病人休息及使用冰敷及壓迫二頭肌。在施予神經毒素約15天後，可以經常性的運動及活動受傷害之肌肉。此病人在來被鼓勵輕微的移動並恢復伸長該肌肉及周圍的肌肉。當毒素之功效漸漸消去，此病人可以有能力快速參與物理治療療程或恢復一般功能及/或運動。若此病人依靠運動營生，肉毒桿菌毒素治療可促使她早日回到此活動中。局部施用自約10單位至約200單位之肉毒桿菌A型毒素亦可施用於長效(2至4月)肌肉固定。

實例3

治療脛骨夾板(Shin Splints)

跑步者通常經歷下肢脛骨夾板，其會引起疼痛並限制活動。較低腿導因於脛骨夾板的疼痛，在連接至脛骨的部位引起腿肌肉非常小的破裂。有兩種形式：1.前脛骨夾板發生於脛骨(tibia)的前部：2.後脛骨夾板發生於沿著脛骨的內

五、發明說明 (35)

部(中間)。

前脛骨夾板導因於肌肉不平衡，不足夠的吸震或腳趾跑動。過度的反轉皆貢獻於前及後脛骨夾板。

於治療使用過度肌肉，如脛骨夾板，建議有五個步驟：
(1)保護受傷害肌肉以防止因使用夾板、墊及/或擔架之更進一步傷害；(2)限制活動，通常有48至72小時可使痊癒步驟開始。施用短效肉毒桿菌E或F型毒素或肉毒桿菌A型毒素修飾物，此可減少A型毒素在體內生物活性期(即較短期之遲緩肌肉麻痺)。適合的肉毒桿菌毒素，包括在體內適合使用生物活性較短之肉毒桿菌A型毒素，被建立並共同申請為美國專利申請案第09/620840號，此申請案併於此作為參考。在更嚴重的肌肉過度使用可限制活動力至少持續數週至數月。因需要較長的限制活動，局部施用長效肉毒桿菌，舉例言之，(未修飾的)肉毒桿菌B型毒素，或更佳地，A型毒素，是適用的。無此治療，病人可能經歷數週的限制活動。當痊癒步驟開始時，建議輕微的運動及移動受傷害的肌肉；(3)冰敷可於每小時使用15至20分鐘；(4)壓迫，如彈性繃帶可在冰敷間保持；及(5)高舉受傷部位以減少腫脹。

實例4

次複製(Subcloning) BoNT/A鏈基因

此實例描述複製編碼BoNT/A-L聚核苷酸序列的方法。此DNA序列編碼BoNT/A-L鏈以PCR方法放大，其使用寡核苷酸序列 5'-AAAGGCCTTTTGTTAATAAACAA-3' (SEQ ID#1)

五、發明說明 (36)

及 5'-GGAATTCTTACTTATTGTATCCTTT-3 (SEQ ID#2)。
使用這些引子可分別導入 Stu I 及 EcoR I 限制位置於
BoNT/A-L 鏈基因片段的 5' 及 3' 端。這些限制位置接著可用
於促進放大產品的單方向次複製。此外，這些引子導入一
停止密碼於 L 鏈編碼序列的 C 端。自肉毒桿菌 (63 A 株) 而來的
染色體 DNA 在此放大反應中作為模版。

此 PCR 放大反應在 100 μ l 體積中進行，包含有 10 mM
Tris-HCl (pH 8.3)，50 mM KCl，1.5 mM MgCl₂，每一去氧
核苷三磷酸 (dNTP) 0.2 mM，每一引子 50 pmol，200 ng 基因
體 DNA 及 2.5 單位的 Taq-聚合酶 (Promega)。此反應混合物被
置於 35 循環的變性作用 (94°C 1 分鐘)，黏接作用 (37°C 2 分
鐘)，及聚合作用 (72°C 2 分鐘)。最後，此反應再延長外加
的 72°C 5 分鐘。

此 PCR 放大產物以 Stu I 及 EcoR I 消化，以洋菜膠電解純
化，及連接至以 Sma I 及 EcoR I 消化的 pBluescript II SK* 以
產生 pSAL 質體。包含此質體的細菌轉型物再依標準程序分
離。鑑定此複製的 L 鏈聚核苷酸乃以雙股質體定序而確認，
此定序以 SEQUENASE (United States Biochemicals) 之使用
指示進行。若需要，則準備合成的寡核苷酸序列引子以達到
重疊序列進行。此複製序列被發現與 Binz 等人在 J. Biol.
Chem. 265:9153 (1990) 及 Thompson 等人在 Eur. J. Biochem.
189:73 (1990) 所揭示的序列相同。

設計針對位置的突變作用以中和 BoNT/A-L 鏈的酵素活
性亦被製造。

五、發明說明 (37)

實例 5

表現肉毒桿菌A型毒素-L (BoNt/A-L)鏈融合蛋白

此實例描述鑑定含pCA-L質體之細菌中，野生型L鏈的表現，其可作為一治療成分。包含pCAL之已分離細菌菌落用於接種含100 µg/ml氨苄青黴素(ampicillin)及2% (w/v)葡萄糖的L-broth中，並在37°C震盪培養。此隔夜培養液以1:10稀釋至新鮮的含100 µg/ml氨苄青黴素L-broth中，再培養2小時。加入最終濃度為0.1 mM的IPTG以誘導融合蛋白表現。在外加4小時在30°C培養4小時後，以離心6,000 x g 10分鐘收集細菌。

小規模的SDS-PAGE分析確認經IPTG誘導細菌90 kDa蛋白質帶的表現。此 M_r 值是與預估具MBP (~40 kDa)及BoNT/A-L鏈(~50 kDa)的融合蛋白大小是一致的。更進一步的，當比較自控制培養物所分離的樣品，此IPTG誘導的菌落本質上包含較大量的融合蛋白。

在IPTG誘導的細菌萃取物中所欲融合蛋白的表現亦以使用描述於Cenci di Bello等人在Eur. J. Biochem. 219: 161 (1993)的多株抗L鏈探針的西方墨點法所確認。在PVDF膜(Pharmacia; Milton Keynes, UK)的反應帶以偶合至辣根過氧化酶(Bio-Rad; Hemel Hempstead UK)的抗兔子免疫原及ECL檢視系統(Amersham, UK)顯現。西方墨點結果確認了顯著的融合蛋白與許多相應於與全尺寸融合蛋白相比較低 M_r 蛋白質模糊的表現。此觀察推定有限的融合蛋白退化作用在細菌或在分離程序中發生。在分離程序中既不使用1 mM

五、發明說明 (38)

也不使用 10 mM 的苯醯胺啉 (benzamidine, Sigma; Poole, UK) 以減低蛋白質分解的打破。

依以上程序分離生產的完整的融合蛋白在此所描述的方法中保持全水溶性。依染色的 SDS-PAGE 膠估計，以 IPTG 誘導的細菌菌落每公升培養液生產 5-10 mg 的全 MBP 野生型或突變 L 鏈蛋白。因此，在此揭示的製造 BoNT/A-L 鏈融合蛋白的方法係為高效率的，縱使有限的蛋白質分解確實發生。

此由 pCAL 及 pCAL-TyrU7 表現質體所編碼的 MBP-L 鏈融合蛋白由澱粉酶親和性層析管柱而自細菌中純化。重組野生型或突變型 L 鏈再由以 X₂ 因子特異位置切裂融合蛋白的糖結合區域而分離。此切裂的程序生產自由的 MBP，自由的 L 鏈及小量未切裂的融合蛋白。當產生表現在該混合物中的 L 鏈顯現出可進行所欲的活性，我們也可應用外加的純化程序。如前所述，切裂產物的混合物應用於第二個澱粉酶親和層析管柱以同時結合 MBP 及未切裂的融合蛋白。自由的 L 鏈不在停留於親和管柱中，而可使用以下描述的實驗而分離。

實例 6

純化融合蛋白及分離重組 BoNT/A-L 鏈

此實驗描述自細菌菌落中生產及純化野生型重組 BoNT/A 輕鏈之方法。將從 1 升表現野生型 BoNT/A-L 鏈蛋白質細菌培養液的沉澱物溶解於包含 1 mM 苯基-甲烷磺醯氯 (phenyl-methanesulfonyl fluoride, PMSF) 及 10 mM 苯醯胺啉

五、發明說明 (39)

的管柱緩衝液中[10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 200 mM NaCl, 1 mM EGTA及1 mM DTT], 再以超音波震盪打碎。此打碎物以在4°C 離心 15,000 x g 15分鐘而澄清。其上清液加入至澱粉酶層析管柱[2 x 10 cm, 30 ml樹脂](New England BioLabs; Hitchin, UK)。自樹脂中未結合的蛋白質以管柱緩衝液沖洗直到洗脫液不含蛋白質, 即為判斷280 nm的穩定吸收度。此結合的MBP-L鏈融合蛋白接著以包含10 mM麥芽糖的管柱緩衝液洗脫。集合及對溶解在20 mM Tris-HCl (pH 8.0)的150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 及1 mM DTT於4°C 透析72小時包含融合蛋白的分液。

當溶解於150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 及1 mM DTT時, 融合蛋白以酵素: 受質比例為1:100之X₂因子(Promega; Southampton, UK)切裂。在4°C 透析24小時。MBP及由切裂步驟而來的野生型或突變L鏈其中之一之混合物置入以管柱緩衝液平衡的10 ml澱粉酶管柱中。為SDS-PAGE分析準備分開收集的流經之分液, 以鑑定含L鏈的樣品。剩餘的流經分液部分儲藏在-20°C中。全部大腸桿菌萃取物或以純化的蛋白質溶解於SDS樣品緩衝液中, 並應用於標準的PAGE程序。此程序的結果指出重組毒素片段粗略佔樣品中蛋白質質量的90%。

前述的結果指出創造描述於此之MBP-L鏈融合蛋白的方法可用於有效率地製造野生型及重組BoNT/A-L鏈。進一步地, 此結果顯示重組L鏈可自融合蛋白地麥芽糖結合位置所分離, 並在其後純化。

五、發明說明 (40)

建立敏感的以抗體為基礎分析以比較重組L鏈產物的酵素活性與天然副本。此分析應用對相應於BoNT/A切裂位置的完整SNAP-25的C端區域具特異性之抗體。SNAP-25的BoNT/A切裂反應產物的西方墨點指出該抗體不能結合至SNAP-25次片段。因此，抗體逆神經毒素應用於下列實例只偵測完整的SNAP-25。抗體結合的喪失可作為由加入BoNT/A輕鏈或其重組衍生物所調節的SNAP-25蛋白裂解指示。

實例7

重組L鏈對SNAP-25受質蛋白分解活性評估

此實例描述證明天然及重組BoNT/A-L鏈皆可蛋白分解SNAP-25受質。使用定量分析以比較野生型及他們的重組類似物切裂SNAP-25受質的能力。使用於此分析中的受質由製備穀胱苷肽-S-轉移酶(glutathione-S-transferase, GST)融合蛋白而獲得，該融合蛋白包括凝血酵素的切裂位置，以使用pGEX-2T載體表現及由穀胱苷肽洋菜親和層析管柱純化。該SNAP-25再被包含50 mM Tris-HCl (pH 7.5)，150 mM NaCl及2.5 mM CaCl₂ (Smith等人，Gene 67: 31 (1988))的凝血酵素自融合蛋白中切裂出來，其中酵素：受質比例為1：100。未切裂的融合蛋白及被切下的穀胱苷肽結合區域則結合在膠體中。該重組SNAP-25蛋白則以後者的緩衝液洗脫而出，並對100 mM HEPES (pH 7.5)在4°C透析24小時。該全部蛋白質濃度以習用之方法測定。

對SNAP-25之C端區域特異的兔子多株抗體，被針對合成

五、發明說明 (41)

的具胺基酸序列CANQRATKMLGSG (SEQ ID#3)之胜肽酶所引起。此胜肽酶相應於突觸細胞膜蛋白的195至206殘基，且N端的胱胺酸不在天然的SNAP-25中發現。此合成的胜肽酶使用馬來醯亞胺苯甲醯基-N-羥基琥珀醯亞胺酯(MBS)作為交叉反應的神經毒素(Sigma: Poole, UK)交聯至牛血清蛋白素(bovine serum albumin, BSA)(Sigma: Poole, UK)以增進抗原性(Liu等人: Biochemistry 18:690 (1979) 1)。抗胜肽酶抗體的親和性純化，使用具由抗原性胜肽酶的N端的胱胺酸殘基交聯至胺基烷基洋菜樹脂(amino agarose resin)(BioRad: Hemel Hempstead, UK)，並以乙基3-(3-二甲基丙基)碳二醯胺交互反應的碘乙酸活化。在成功的以含25 mM Tris-HCl (pH 7.4)及150 mM NaCl之緩衝液洗清管柱後，使用100 mM甘胺酸(pH 2.5)及200 mM NaCl以洗脫胜肽酶特異之抗體，並收集於含0.2 ml的1 M Tris-HCl (pH8.0)中和緩衝液的管中。

包含野生型L鏈的全部重組製備於進行他們的酵素活型前，在4°C對包含0.02% Lubrol及10 μ M乙酸鋅的100 mM HEPES (pH 7.5)透析隔夜。之前以20 mM DTT在37°C還原30分鐘的BoNT/A也和這些透析樣品一樣，接著以後者的溶有1 mM DTT的HEPES緩衝液稀釋成不同濃度。

反應混合物包含5 μ l重組SNAP-25受質(最終濃度為8.5 μ M)及20 μ l還原的BoNT/A或重組野生型L鏈。全部的樣品在以25 μ l水溶性2%三氟乙酸(trifluoroacetic acid, TFA)及5 mM EDTA (Foran等人, Biochemistry 33: 15365 (1994))淬

五、發明說明 (42)

滅(quenching)前先在 37°C 靜置 1 小時。為 SDS-PAGE 及以 SNAP-25 多株抗體的西方墨點分析準備每一樣品的分液，其係加入 SDS-PAGE 樣品緩衝液及煮沸。抗-SNAP-25 抗體反應力以 ECL 監測系統監看，並以照片黑度掃描量化。

西方墨點結果指出純化的突變 L 鏈及天然或重組野生型 BoNT/A-L 鏈在蛋白分解活性上清楚的區別。特別的，重組野生型 L 鏈較還原性 BoNT/A 天然 L 鏈(在此方法中作為正向控制組)具略低之效率切裂 SNAP-25 受質。因此，BoNT/A-L 鏈的酵素活性型式可用重組方法製造並在其後分離。更進一步的，在 L 鏈蛋白的單一胺基酸取代取消了重組蛋白退化突觸端蛋白的能力。

經由此野生型重組 BoNT/A-L 鏈生物活性的初步測試中，測試 MBP-L 鏈融合蛋白減小自毛地黃皂苷可通透牛腎上腺色素細胞中 Ca^{2+} 引起的兒茶胺酚的釋放。接著，野生型重組 L 鏈融合蛋白，完整或以 X_2 因子切裂型式產生包括自由 MBP 及重組 L 鏈的混合物，誘導了與天然 BoNT/A 導致的抑制作用相當的 Ca^{2+} 刺激釋放的劑量倚靠抑制。

實例 8

重構天然 L 鏈、以純化的 H 鏈重組野生型 L 鏈

天然的 H 及 L 鏈可以 2 M 尿素自 BoNT/A 中分離(List Biologicals Inc.: Campbell, USA)，以 100 mM DTT 還原，再依已建立的岑析分析步驟純化(Kpzaki 等人, Japan J. Med. Sci. Biol. 34: 61 (1981); Maisy 等人, Eur. J. Biochem. 177: 683 (1988))。純化後的 H 鏈和相當莫耳量的天然 L 鏈

五、發明說明 (43)

或重組野生型L鏈其中之一結合。重構作用在對由25 mM Tris (pH 8.0), 50 mM乙酸鋅及150 mM NaCl所構成的緩衝液在4°C透析樣品4天時進行。接下的透析, 重組L鏈及天然H鏈的結合以形成雙硫鍵結的150 kDa雙鏈可由SDS-PAGE監看及以照片黑度掃描量化。雙鏈分子與重組L鏈形成部分較當使用天然L鏈時為低。事實上, 只有約30%的重組野生型或突變型L鏈可重構, 而>90%的天然L鏈可和H鏈重新結合。雖然重構的效率低, 足夠的合併重組L鏈材料可輕易製造, 以使用於接下的功能性分析。

當本發明以許多特異的例子及實施例所描述, 須被了解的是本發明並不限定於此, 並可在以下的申請專利範圍內不同地實行。其它位於本發明範圍內之實施例, 敘述及修飾是可能的。舉例言之, 自約500單位至約4,000單位的肉毒桿菌B型毒素, 可被用於治療根據本發明所揭示的肌肉傷害。

申請日期	90.9.7
案 號	090122250
類 別	A61K 38/48

A4

C4

中文說明書替換頁(96年9月)

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書
新 型

一、發明 名稱	中 文	治療肌肉傷害之醫藥組合物
	英 文	PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS FOR TREATING MUSCLE INJURIES
二、發明人 創作	姓 名	1.格洛葛利 F. 布魯克斯 GREGORY F. BROOKS 2.凱 羅傑 艾歐基 KEI ROGER AOKI
	國 籍	1.-2.均美國
三、申請人	住、居所	1.美國加州歐文鎮力貝拉街3號 2.美國加州可托迪卡札市吉傑利力巷2號
	代 表 人 姓 名	馬丁 阿 福耶特 MARTIN A. VOET

四、中文發明摘要(發明之名稱: 治療肌肉傷害之醫藥組合物)

治療肌肉傷害之方法，其係局部施用神經毒素，如肉毒桿菌毒素，以促進痊癒及/或減低因肌肉傷害所引起之疼痛。

英文發明摘要(發明之名稱: PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS FOR TREATING MUSCLE INJURIES)

Methods for treating an injured muscle by local administration of a neurotoxin, such as a botulinum toxin, to promote healing and/or to reduce the pain associated with an injured muscle.

六、申請專利範圍

P3-6 24

1. 一種用於治療肌肉傷害之醫藥組合物，其包含治療有效量之肉毒桿菌毒素。
2. 根據申請專利範圍第1項之醫藥組合物，其係經肌肉內注射作局部施用。
3. 根據申請專利範圍第1項之醫藥組合物，其中該肉毒桿菌毒素係實質上固定該受傷害之肌肉。
4. 根據申請專利範圍第1項之醫藥組合物，其中該肉毒桿菌毒素係在受傷害之肌肉修復過程的時期1與時期2時有效地固定受傷害之肌肉。
5. 根據申請專利範圍第1項之醫藥組合物，其中該肉毒桿菌毒素係在受傷害之肌肉修復過程的時期1時有效地固定受傷害之肌肉。
6. 根據申請專利範圍第1項之醫藥組合物，其中該肉毒桿菌毒素係為肉毒桿菌A、B、C₁、D、E、F或G型毒素。
7. 根據申請專利範圍第1項之醫藥組合物，其中該肉毒桿菌毒素係重組製造之肉毒桿菌毒素。
8. 根據申請專利範圍第1項之醫藥組合物，其係用於與物理治療及/或外科手術治療受傷害肌肉作組合。
9. 一種用於活體內治療受傷害肌肉之醫藥組合物，其包含治療有效量之肉毒桿菌毒素。
10. 根據申請專利範圍第9項之醫藥組合物，其中該肉毒桿菌毒素係為肉毒桿菌A型毒素。
11. 一種用於活體內促進受傷害之肌肉痊癒之醫藥組合物，其包含治療有效量之肉毒桿菌A型毒素。

六、申請專利範圍

12. 一種用於活體內治療與受傷害肌肉有關疼痛之醫藥組合物，其包含治療有效量之肉毒桿菌毒素。
13. 根據申請專利範圍第12項之醫藥組合物，其中該肉毒桿菌毒素係為肉毒桿菌A型毒素。